

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI URBINO
“CARLO BO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARE (DiSB)

DOTTORATO IN “MECCANISMI DI REGOLAZIONE CELLULARE:
ASPETTI MORFO-FUNZIONALI ED EVOLUTIVI”

XXVIII CICLO

*“Studio delle correlazioni fra parametri metabolici e concentrazione
di magnesio sierico ed intracellulare.”*

Settore Scientifico Disciplinare: Bio/16

Relatore: Chiar.mo Prof. Pietro Gobbi

Dottorando: Dott. Guglielmo Ragazzoni

Anno Accademico: 2014/2015

Sommario

1. Introduzione 4

1.1 Storie e proprietà chimiche del magnesio 4

1.2 Il magnesio nei sistemi biologici 5

2. Obiettivi della ricerca 8

3. Definizione della Sindrome Metabolica 9

3.1 Criteri per la definizione di Sindrome Metabolica 9

3.2 Epidemiologia della Sindrome Metabolica 10

3.3 Correlazione tra Magnesio e Sindrome Metabolica 11

4. Impostazione della ricerca 13

4.1 Materiali e metodi utilizzati 13

4.2 Genesi del microscopio ESEM 14

4.3 Caratteristiche funzionali del microscopio ESEM 14

4.4 Notizie sul microscopio ESEM utilizzato durante le analisi 17

4.5 Il magnesio spray 18

4.6 Ulteriori tipi di analisi svolte 19

4.7 Selezione dei soggetti 20

5. Attività di ricerca 21

5.1 Metodi di analisi statistica 21

5.2 Risultati ottenuti nella fase di ricerca 22

5.3.1 Spettri relativi alla prima tornata di analisi 23

5.3.2 Spettri relativi alla seconda tornata di analisi 26

5.3.3 Spettri relativi alla terza tornata di analisi 29

6. Analisi e discussione dei risultati 34

7. Note bibliografiche 39

1.Introduzione

1.1 Storia e proprietà chimiche del magnesio

Il magnesio (Mg) è un metallo alcalino-terroso, che appartiene al Gruppo II della tavola periodica degli elementi e ha numero atomico 12.

Il nome origina da una città storica della Tessaglia, nella Grecia antica, chiamata appunto Magnesia.

Il termine magnesia veniva generalmente usato in ambito alchemico per indicare sostanze chimicamente simili per consistenza e colore, estratte nei pressi di questa città.

Fu solo nel 1755 che venne per la prima volta identificato come elemento dall'inglese Joseph Black e bisogna aspettare il primo decennio del XIX secolo per ottenere una forma di magnesio metallico ad opera di Sir Humphrey Davy.

Essendo il magnesio in forma metallica pura molto reattivo, è molto più facile individuarlo nella sua forma cationica Mg^{2+} , sia in soluzione acquosa oppure in forma solida come sale o come minerale.

I sistemi biologici trovano nell'idrosfera la fonte più accessibile di magnesio, per via dell'ottima solubilità dei sali di questo elemento nell'ambiente acquoso, al contrario dei sali di altri elementi fondamentali come il calcio, che tendono a precipitare in solventi acquosi.



Figura 1: magnesio in forma metallica pura. Immagine tratta da www.scienceforlife.com

1.2 Il magnesio nei sistemi biologici

Il magnesio è un minerale essenziale in ogni organismo¹ e nel corpo umano risulta essere per abbondanza, dopo il potassio, il secondo catione intracellulare e il quarto se si prendono in esame anche le concentrazioni ematiche degli ioni extracellulari.²

Alcuni autori sono arrivati a definire il magnesio “l'elettrolita dimenticato”^{40,41} a causa dei sottostimati effetti dell'ipomagnesemia, anche se quest'ultima risulta essere un'importante deficienza elettrolitica.

Sono oltre 300 gli enzimi, che richiedono la presenza del magnesio come cofattore per espletare la loro azione catalitica ed esempi mirabili sono tutti gli enzimi responsabili della sintesi ATPasica.

Altri enzimi di cui il magnesio è cofattore essenziale sono quelli che si occupano di mantenere l'integrità della membrana cellulare e quelli preposti alla trasmissione di segnali, al funzionamento delle pompe ioniche, all'apertura-chiusura dei canali di membrana e all'attività di trasporto, garantendo la continua e fondamentale attività di polarizzazione e depolarizzazione delle membrane stesse.³

Il catione magnesio si occupa della chiusura di certi tipi di canali calcio-dipendenti preposti all'entrata di ioni calcio caricati positivamente nei neuroni. Un possibile eccesso di magnesio potrebbe bloccarli rallentando l'attività di queste cellule del nervoso.⁴

Alcuni studi⁵ hanno dimostrato, che esista una correlazione inversa tra l'aumento della pressione arteriosa ed i livelli di magnesio, portando così ad ipotizzare un suo coinvolgimento diretto nell'insorgere di questa patologia.

Un aumento delle concentrazioni plasmatiche di magnesio potrebbero ridurre il rischio d'insorgere dell'ipertensione arteriosa ed anche dell'aumento dei trigliceridi e delle lipoproteine ad alta densità.⁶

Altri studi⁷ indicano un altro elemento positivo nell'aumento dei livelli di

magnesio attraverso diete, connesso con la diminuzione dei livelli di proteina C-reattiva e di altri biomarkers proinfiammatori.

Elementi interessanti, che hanno costituito una base di partenza per questo triennale lavoro di ricerca, sono stati studi, che hanno ipotizzato un ruolo centrale del magnesio nel mantenimento dell'omeostasi glucidica, regolando la sensibilità tissutale nei confronti dell'azione dell'insulina.⁸

L'analisi dettagliata di questi studi, riguardante il deficit dell'assunzione di magnesio attraverso la dieta, la sua concentrazione nel torrente ematico e l'incidenza dei fattori di rischio generanti la Sindrome Metabolica, detta anche sindrome da insulino resistenza, ha portato a risultati divergenti.⁹¹⁰¹¹¹²

Un limite, che è possibile individuare in tutti gli studi presi in esame, riguarda le modalità di ricerca del magnesio: le concentrazioni di magnesio osservate, sono sempre state quelle plasmatiche, omeostaticamente controllate dai reni¹³ e quindi suscettibili di variazioni molto lievi, mentre poco si è fatto per controllare quelle intracellulari, ben più importanti, poiché la maggior parte del magnesio corporeo è ivi conservato.¹⁴

All'inizio di questo lavoro di ricerca non è stato possibile individuare analisi dettagliate delle concentrazioni intracellulari di magnesio, benché si sia provato ad intraprendere questa strada mediante tecniche di spettroscopia NMR nei globuli rossi¹⁵, che è la tecnica più efficace per identificare velocemente prodotti di reazione o composti organici incogniti, o nei monociti attraverso nano analisi intracellulari.^{16 17}

Né si è trovato riscontro su correlazioni tra i livelli di magnesio intracellulari, la significatività degli indicatori di sindrome metabolica e possibili miglioramenti nella salute nei pazienti portatori di questa sindrome, attraverso l'aumento delle concentrazioni di magnesio intracellulare mediante somministrazioni per via transcutanea.

L'efficacia dell'assorbimento transcutaneo di magnesio la correlazione in senso inverso tra le concentrazioni di magnesio intracellulare e gli indicatori di rischio metabolico hanno costituito l'obiettivo di questa ricerca, che ha

avuto come fine ulteriore la possibilità di mitigare gli effetti della SM nei pazienti attraverso una corretta implementazione del catione magnesio e diminuire così gli indici di rischio per lo sviluppo di diabete e patologie cardiovascolari, come suggerito dagli studi indicati.

Il metodo scelto per l'integrazione di magnesio è stato quello per via transcutanea, così da evitare tutti gli effetti collaterali derivanti dal sovradosaggio di magnesio per via orale, quali nausea, diarrea, dispepsia e dolore addominale, battito cardiaco irregolare, bassa pressione arteriosa, confusione e depressione respiratoria.

Nell'adulto non affetto da problemi di insufficienza renale, quindi non a rischio di ipermagnesemia, la dose massima di magnesio consigliata è di 350mg/die nell'uomo e 300mg/die nella donna.

Questa strategia è già stata utilizzata in passato come coadiuvante nelle terapie antidepressive.¹⁸

2. Obiettivi della ricerca

L'assunto originario di questa ricerca teorizzava, che i livelli di magnesio potessero essere implementati per via transcutanea e che nei pazienti affetti da sindrome metabolica vi fosse una minore e non fisiologica concentrazione di magnesio a livello intracellulare.

Il percorso di ricerca è constato di due fasi più una terza, che si sarebbe attuata solo nell'eventualità che le prime due fasi avessero dato i risultati sperati.

Nella prima fase dello studio si è previsto di valutare l'assorbimento transcutaneo di magnesio in otto soggetti sani e costantemente controllati da personale medico, mediante una soluzione sovrasatura di magnesio cloruro (MgCl) al 33%.

Questo controllo si sarebbe fatto mediante l'analisi al microscopio ESEM-EDS delle cellule di sfaldamento della mucosa orale, prelevate in modo non traumatico per mezzo di una spatolina.

La seconda fase prevedeva l'analisi delle concentrazioni di magnesio intracellulare in quindici soggetti affetti da sindrome metabolica, sempre mediante i rilevamenti sulle cellule di mucosa orale da effettuarsi al microscopio ESEM-EDS.

La terza fase della ricerca, che si spera di iniziare al più presto, prevede la somministrazione di magnesio cloruro per via transdermica a soggetti affetti da sindrome metabolica, allo scopo di verificare se vi sia un'evoluzione positiva della patologia cronica con un attenuarsi dei vari sintomi ad essa correlati.

3. Definizione della Sindrome Metabolica

La sindrome metabolica, o anche detta sindrome da insulino-resistenza, venne descritta per la prima volta da Reaven nel 1988 e consta in una serie di alterazioni di alcuni parametri metabolici, collegati all'insulino-resistenza¹⁹, che portano all'insorgere di problemi cardio-vascolari.

Questi parametri sono collegati allo stile di vita dell'ammalato, obesità e vita sedentaria, ma possono sussistere già in una condizione precedente all'insorgere della patologia, come per esempio l'ipercolesterolemia.

Le persone più colpite da questa sindrome sono in genere anziane e la mortalità, in assenza di efficaci e durature contromisure, è in genere elevata e dovuta all'aggravarsi di problemi cardiovascolari²⁰.

Negli ultimi tempi la sindrome è stata meglio definita come sindrome plurimetabolica e comprende l'associazione di insulino-resistenza iperinsulinemia, obesità centrale, intolleranza glucidica, diabete mellito di tipo 2, iperuricemia, dislipidemia e ipertensione arteriosa.

3.1 Criteri per la definizione di Sindrome Metabolica

Secondo le linee guida redatte nel 2005 dalla *International Diabetes Federation*²¹, si può diagnosticare in un paziente l'insorgenza della sindrome metabolica, quando almeno tre di seguenti parametri risultano alterati:

- glicemia a digiuno superiore o uguale ai 100 mg/dl;
- trigliceridi superiori o uguali ai 150 mg/dl;
- ipertensione arteriosa oltre i 130/85 mm Hg o presenza di terapia farmacologia ipotensivante²²;
- colesterolo HDL inferiore ai 40 mg/dl nei maschi e 50mg/dl nelle femmine;

- circonferenza addominale superiore ai 102 cm nei maschi e agli 88 cm nelle femmine.

Come già accennato in precedenza, fattore di rischio non trascurabile rimane l'età, che risulta determinante a partire dai 45 anni negli uomini e dai 55 anni nella popolazione di sesso femminile.

La sindrome metabolica non viene considerata di per sé una malattia, ma viene vista più come il punto di partenza per patologie strettamente collegate all'insulino-resistenza e molto spesso da subito invalidanti come le malattie cardiovascolari ed il diabete di tipo 2.²³

3.2 Epidemiologia della Sindrome Metabolica

Non sempre la sindrome metabolica è stata valutata in associazione con tutti i suoi sintomi e le sue manifestazioni e per questo la percentuale della popolazione affetta da questa sindrome varia molto in base ai parametri presi in esame.

Dati precisi sulla popolazione italiana non ve ne sono, ma le ultime stime, considerati tutti i fattori di rischio prima elencati, indicano che circa un 25% della popolazione adulta sia interessata da questa sindrome.²⁴

Recenti dati epidemiologici italiani ricavati da uno studio prospettico-randomizzato condotto nella cittadina di Brunico²⁵, piccolo centro della provincia di Bolzano, evidenziano che la prevalenza di tale sindrome risulta essere del 34,1% e del 17,8%, a seconda dei criteri diagnostici proposti, e con un picco massimo nella fascia d'età tra 65 e 74 anni.

Anche prendendo in considerazione il dato epidemiologico più basso, non si può che rimanere assai colpiti dalla forte incidenza di questa sindrome sulla popolazione anziana.

3.3 Correlazioni tra magnesio e sindrome metabolica

Vi sono vari studi, alcuni condotti sino dalla metà degli anni settanta²⁶, che attestano di un'evidente correlazione tra il magnesio e l'insulino-resistenza²⁷. Il magnesio, presente in condizioni fisiologiche, riveste un ruolo fondamentale nella modulazione dell'azione insulinica, ma negli stati di insulino-resistenza, di cui la sindrome metabolica è una delle prime evidenze dal punto di vista clinico, si riscontra una diminuzione dei suoi livelli e quindi della sua azione. Anche in alcune forme di malattie ipertensive possiamo notare simili bassi livelli di magnesio²⁸.

Si può parlare di ipomagnesemia quando la concentrazione ematica di magnesio è inferiore alle 0.61 mmol/L o 1.5 mg/dL⁴². Concentrazioni inferiori alle 0.75 mmol/L o 1.8 mg/dL possono essere considerate come uno stadio preclinico di ipomagnesemia⁴³.

Altri studi indicano che una difettosa azione della tirosina-chinasi, con conseguente alterazione dei recettori insulinici, è causata da una deplezione dei livelli di magnesio²⁹, ma è anche causa di un non corretto utilizzo del glucosio a livello cellulare con un'azione di insulino-resistenza pure a livello post-recettoriale³⁰.

Non solo le persone anziane o i maschi adulti sopra i 45 anni sono afflitti da stati carenziali di magnesio associati all'insulino-resistenza: uno studio³¹ pubblicato nel 2005 mostra come nei bambini affetti da obesità ci sia un forte rischio per l'insorgenza del diabete di tipo 2, ma che tale rischio possa essere considerevolmente ridotto attraverso la supplementazione di sali di magnesio attraverso la dieta.

Altri studi randomizzati³² e condotti in doppio cieco, hanno dimostrato la validità dell'assunzione di sali di magnesio per via orale come contrasto all'avvento dell'insulino-resistenza, ma in tali studi l'assunzione di magnesio è sempre avvenuta per via orale e la verifica dell'effettivo assorbimento di magnesio si è espletata solamente sui suoi livelli sierici, senza poter

approfondire oscillazioni intracellulari di questo catione.

In seguito alle evidenze dimostrate dagli studi citati e preso atto delle importanti conoscenze metaboliche sviluppate³³, si è ritenuto opportuno continuare a cercare un'ulteriore via per la somministrazione di magnesio, provando a superare i limiti, ben noti, della sua somministrazione per via orale, ma al contempo continuando a garantire l'utilità dell'assunzione di questo fondamentale catione per altre vie.

4. Impostazione della ricerca

4.1 Materiali e Metodi utilizzati

La ricerca del magnesio sull'esfoliato di mucosa orale, prelevato in maniera non traumatica per raschiamento mediante una spatolina in materiale inerte, è stata condotta attraverso un microscopio ESEM-EDS. Proprio in questo metodo di analisi, unito all'utilizzo della soluzione ipersatura di magnesio somministrata per via transepiteliare, sta la novità e l'originalità di questo metodo di ricerca.

L'utilizzo delle cellule di mucosa orale è stato motivato da più vantaggi: il primo è sicuramente la facilità di prelievo dei campioni mediante la spatolina, il secondo risulta essere la morfologia di queste cellule, non corneificate, con un nucleo/citoplasma, che ne facilita l'identificazione al microscopio. Non ultimo vi è il significativo vantaggio di un veloce ricambio cellulare, circa 60 giorni, così da avere la possibilità di verifica di incorporazione intracellulare di magnesio in tempi sufficientemente brevi.

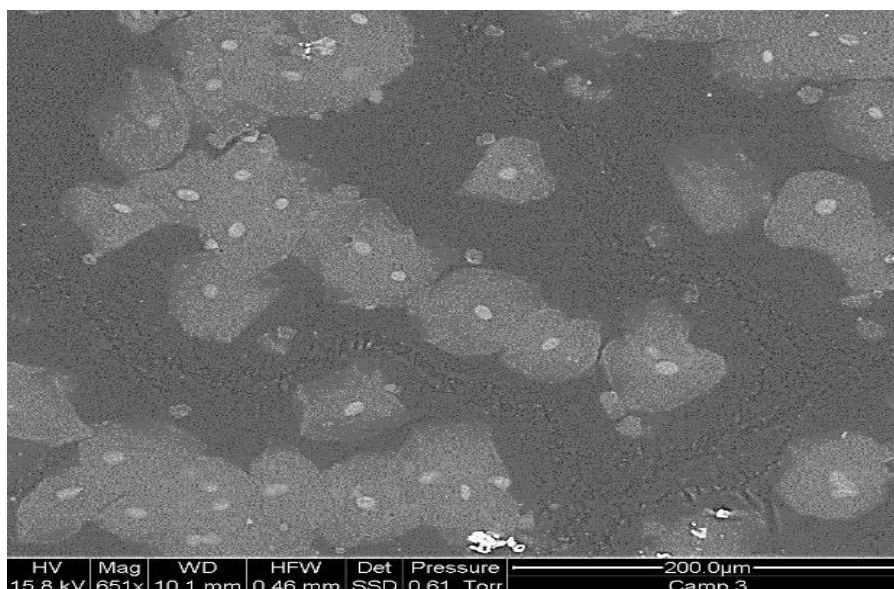


Figura 2: cellule di epitelio orale del campione numero 3 riprese al microscopio Esem durante la prima sessione di ricerca. Sono facilmente riconoscibili i nuclei cellulari, il citosol e alcuni organuli. L'ingrandimento di quest'immagine è 651x e la pressione di 0,61 Torr

4.2 Genesi del microscopio ESEM

Le prime intuizioni sulla possibilità di analizzare i campioni biologici immersi in un ambiente gassoso o acquoso, mediante una scansione di elettroni, si devono al tedesco Manfred von Ardenne³⁴ e risalgono addirittura ai primi anni quaranta del ventesimo secolo.

Tuttavia bisogna aspettare fino al 1970 per avere delle immagini di campioni biologici vivi, quindi non trattati preventivamente con tecniche invasive, grazie al contributo di Lane³⁵, che mise a punto il primo microscopio SEM, acronimo che sta per “scanning electron microscope”, ovvero microscopio elettronico a scansione.

Nel 1978 fa la sua comparsa il primo vero e proprio ESEM, presso la New South Wales University di Sidney ad opera di Geranimos Danatilatou³⁶.

Questo innovativo microscopio permetteva di osservare i campioni biologici a temperature ambientali ed a pressioni variabili fino a raggiungere quella atmosferica.

La prima commercializzazione del microscopio ESEM si ha nel 1988 da parte

della Electron Scan corporation di New Orleans. Grande risalto ebbero la possibilità di analizzare a temperatura e pressione ambientale gli elettroni retrodiffusi per mezzo di un apposito rilevatore (tecnica BSE) e l'analisi degli elettroni cosiddetti secondari (SE)³⁷, sempre grazie ad apposito detector, due brevetti chiave nel successo immediato del microscopio ESEM, nonostante i costi di acquisto del microscopio permanessero molto elevati.

4.3 Caratteristiche funzionali del microscopio ESEM

Il microscopio ESEM è un tipo di microscopio elettronico a scansione (SEM), con sorgente ad emissione di campo (FEG), che presenta prestazioni migliorate rispetto ad un normale SEM, in quanto permette l'osservazione di preparati biologici anche in assenza di processi di metallizzazione o essiccamento preventivi. Questi campioni, come già accennato, possono essere quindi non conduttivi, umidi, bagnati o, addirittura, liquidi.

L'ESEM lavora utilizzando un fascio di elettroni prodotto da una sorgente e mediante delle lenti elettromagnetiche, le quali permettono all'operatore di direzionare il fascio sul campione da analizzare a seconda delle necessità.

I fasci di elettroni interagiscono con lo strato di superficie del campione e producono diversi segnali, come elettroni secondari, elettroni BSE e raggi X, che vengono a loro volta raccolti mediante appropriati rivelatori. Questi rivelatori trasducono il rimbalzo degli elettroni sul campione codificandone l'immagine, che verrà poi trasmessa e riprodotta pixel dopo pixel sul monitor di un computer.

Viene di seguito riportate un'immagine, che spiega in maniera piuttosto semplice il funzionamento del microscopio ESEM.

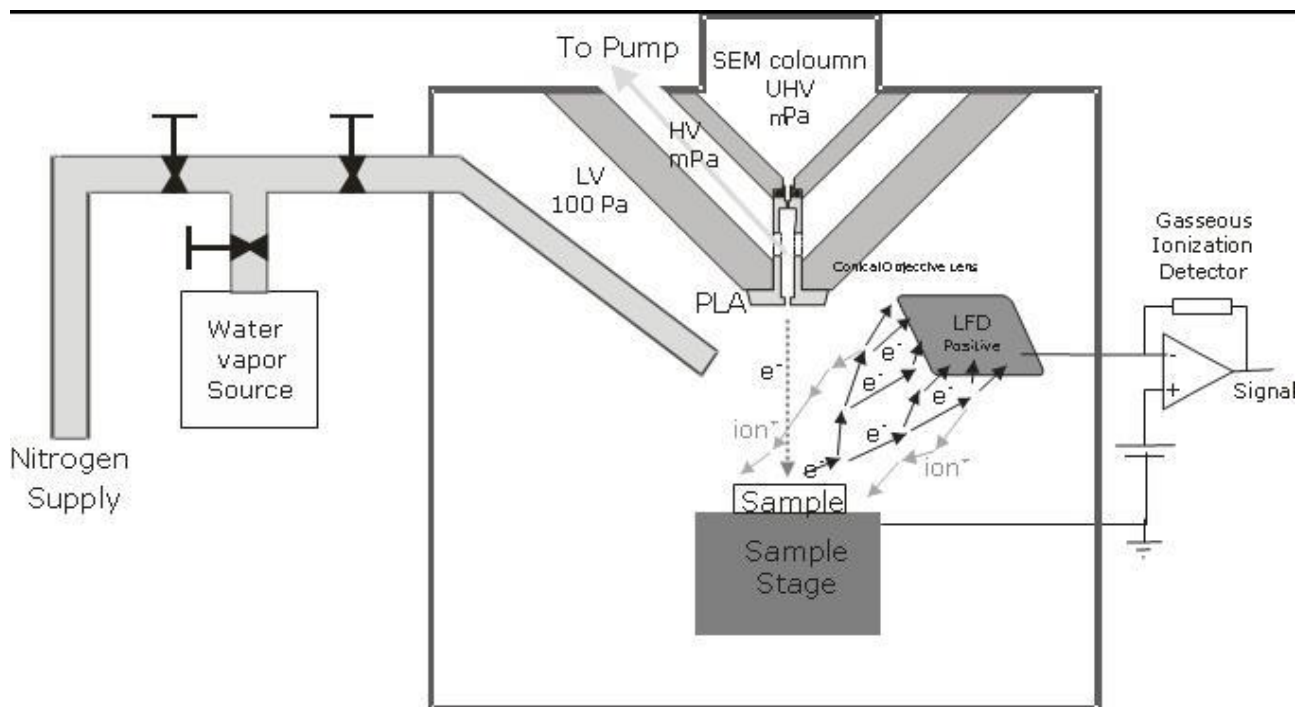


Figura 3: funzionamento schematico del microscopio ESEM. Immagine tratta da "The Opensource Handbook of Nanoscience and Nanotechnology" https://en.wikibooks.org/wiki/Nanotechnology/Electron_microscopy#Scanning_electron_microscopy_.28SEM.29.



Figura 4: foto rappresentante il modello di microscopio ESEM utilizzato per il lavoro di ricerca con in evidenza il detector EDAX e la bombola contenente l'azoto liquido, che funge da refrigerante.

Il microscopio ESEM presenta tre maggiori modalità operative;

- Modalità ALTO VUOTO: permette di osservare campioni conduttivi e/o metallizzati;
- Modalità BASSO VUOTO: consente l'analisi di materiale non disidratato e soprattutto non conduttivo, quindi campioni allo stato naturale senza bisogno di metallizzazione o carbonizzazione, operazioni volte a renderli conduttivi;
- Modalità ESEM: ideale per l'osservazione di campioni con alto contenuto di acqua, umidi o addirittura conservati in acqua. Infatti, impostando all'interno della camera una determinata temperatura e pressione, si può controllare l'umidità relativa che si viene a creare nella camera, mantenendo il campione umido. Lavorare in modalità ESEM è molto utile soprattutto con campioni umidi o conservati bagnati in quanto è un metodo che non richiede una preparazione del campione e soprattutto non risulta invasivo, riuscendo a mantenere inalterate le caratteristiche strutturali naturali del campione stesso. Dopo l'osservazione il materiale analizzato non risulta compromesso e può

essere conservato e riosservato a distanza di tempo.

La microanalisi viene effettuata tramite uno spettrometro EDS, *Energy Dispersive Spectrometer*, che rileva il segnale degli elettroni caratteristici. Il risultato viene descritto mediante grafici sui quali viene riportato, sull'asse orizzontale, il livello di energia dei raggi X, caratteristico di ogni elemento, e sull'asse verticale il numero di "conte", ovvero i quanti di raggi X giunti allo spettrometro per ogni livello di energia. L'altezza ed ampiezza dei picchi da fornisce un'informazione qualitativa sulla maggiore o minore presenza nel campione di un determinato elemento.

Questo strumento permette quindi di esaminare campioni biologici, comprese cellule vive, senza intaccarne l'integrità e di ripetere l'osservazione ogni volta lo si desideri.

Nell'industria biomedicale, permette l'analisi morfologica del campione ma soprattutto quella qualitativa e quantitativa degli elementi che la costituiscono.

4.4 Notizie sul microscopio Esem utilizzato durante le analisi

Il microscopio ESEM utilizzato per questo lavoro di ricerca, si trova presso la sede ARPAM di Pesaro ed è di proprietà dell'Università degli Studi di Urbino Carlo Bo.

Esso è un FEI Quanta 200 FEG (FEI Hillsboro, OR USA) equipaggiato con uno spettrometro EDAX (EDAX Inc. Mahwah NJ, USA), fornito di un detector a raggi X ECON 6 (EDAX Carbon Oxide Nitrogen) Ultra Thin Window, rilevatore in grado di individuare qualsiasi elemento presente nella tavola periodica degli elementi e con un numero atomico superiore a 5, supportato da un software dedicato Genesis Analysis.

Durante tutte le analisi lo strumento è stato utilizzato in modalità Basso-Vuoto mantenendo un voltaggio massimo di 30 kV ad ingrandimenti variabili, così da evidenziare le aree cellulari da analizzare. Ogni campione è stato misurato almeno tre volte per una durata di 100 secondi ed un Amp Time di 51.

4.5 Il magnesio spray

Il magnesio, in forma di soluzione sovrasatura, definizione di una soluzione secondo la nomenclatura IUPAC (Internazional Union of Pure an Applied Chemistry) nella quale il solvente contiene più soluto della massima quantità che può contenere alle condizioni di equilibrio termodinamico, al 33% di cloruro di magnesio, è stato fornito ai soggetti interessati dalla prima parte della ricerca in formato spray.

Ogni confezione, realizzata su specifiche di questa ricerca ed in conformità con gli standard italiani ed europei presso i laboratori della VPS Group di Villafontana (BO), conteneva 100 millilitri di soluzione, addizionata con i seguenti agenti veicolanti: polisorbato 20, fenossietanolo, acido benzoico, acido deidroacetico ed etilexilglicerina.

Il polisorbato 20 appartiene ad una classe di emulsionanti polimerici ottenuti mediante l'unione del sorbitolo con l'ossido di etilene esterificato degli acidi grassi. Essi trovano applicazione nel campo farmaceutico, cosmetico ed alimentare e servono per favorire la solubilizzazione di sostanze lipofile in basi idrofile. Con l'introduzione dei gruppi ossietilenici le proprietà idrofile vengono aumentate sicché i polisorbati vengono considerati degli emulsionanti O/A (olio in acqua).

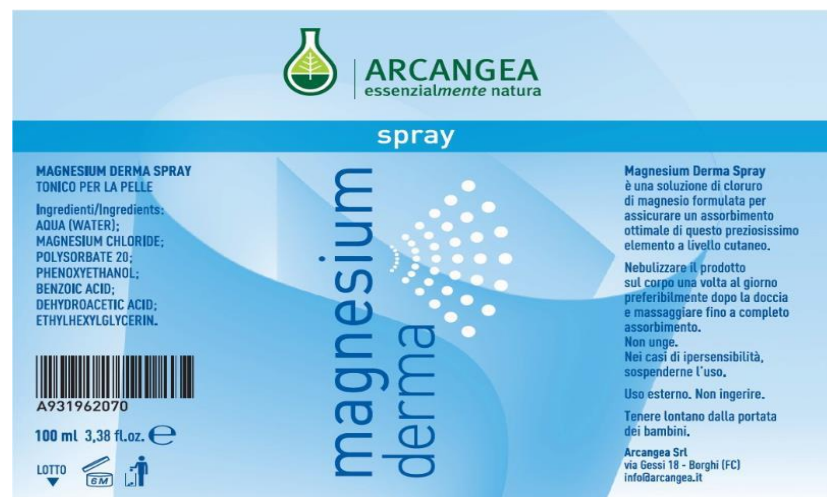
Il fenossietanolo è un glicole utilizzato come conservante battericida nella formulazione di creme per il corpo, per il viso e in alcuni tipi di soluzioni acquose.

L'acido benzoico, sigla E210, è un altro conservante, usato insieme con i suoi sali, che sono molto più solubili, in concentrazioni molto basse a causa della sua tossicità. La sua concentrazione di utilizzo non supera mai lo 0,1%.

Come l'acido benzoico anche l'acido deidroacetico e i suoi sali vengono utilizzati come conservanti nell'industria cosmetica. La sua concentrazione di utilizzo è di norma dello 0,6% nell'ambito delle soluzioni.

L'etilexilglicerina è l'etere glicerico dell'alcol 2-etilesilico ed è un composto sintetico derivante dai cereali. Viene largamente impiegata in ambito cosmetico come conservante, perché particolarmente attiva contro i batteri gram positivi, in special modo contro quelli responsabili della formazione di cattivi odori ed è per questo motivo ampiamente utilizzato nei prodotti deodoranti. Associata agli altri conservanti presenti in questa soluzione, ne amplia e potenzia lo spettro d'azione. Si usa generalmente in concentrazioni comprese tra lo 0.2 e il 3%.

Sono di seguito riportate le immagini relative alla confezione di magnesio spray ed il contenuto dell'etichetta presente sulla stessa.



Ai soggetti coinvolti nella prima fase della ricerca è stato chiesto di spruzzarsi il magnesio spray ogni giorno dopo la doccia. La quantità prevista era di dieci “puff” di soluzione spray e questa modalità di somministrazione è proseguita per quattro mesi.

4.6 Ulteriori tipi di analisi svolte

Oltre alle analisi sulle concentrazioni di magnesio intracellulare svolte al microscopio ESEM sono state condotte anche delle analisi emato-chimiche. In contemporanea con la rimozione dell'esfoliato orale, sono state condotte

anche le analisi sulle concentrazioni di magnesio sierico, mediante il prelievo di sangue venoso.

Questi prelievi e i seguenti dosaggi sono avvenuti nell'arco di una settimana dalla rimozione con spatolina dell'esfoliato presso i presidi sanitari dell'Azienda USL di Rimini.

4.7 Selezione dei soggetti

Questo lavoro di ricerca è stato diviso in due parti: nella prima si è inteso verificare l'efficacia dell'assorbimento transepiteliale di magnesio su soggetti sani, mentre nella seconda sono stati presi in esame soggetti affetti da sindrome metabolica.

Durante la prima fase di studio sono stati reclutati otto³⁸ soggetti sani e di sesso maschile la cui età era compresa tra i 30 ed i 55 anni³⁹.

Tutti questi soggetti appartenevano alla Stazione della Polizia Stradale di Riccione ed erano in servizio permanente effettivo, quindi sottoposti a rigorosi controlli medico-sanitari ad intervalli regolari, pena la decadenza dal servizio attivo.

I criteri di esclusione da questo studio prevedevano: l'abuso di sostanze alcoliche, l'uso di farmaci diuretici, l'uso di farmaci calcio-antagonisti, la presenza di cardiopatie e di malattie renali, il diabete e l'anamnesi di assunzione di magnesio in qualsiasi forma nei due mesi precedenti allo studio.

In accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki, l'insieme dei principi etici, che riguardano la sperimentazione umana, tutti i partecipanti allo studio sono stati preventivamente informati degli scopi della ricerca mediante un'informativa scritta con successiva richiesta del consenso per la conduzione dello studio ed il trattamento dei dati inerenti.

5. Attività di ricerca

5.1 Metodi di analisi statistica

Avendo ideato due differenti modalità di lavoro per questa ricerca, si è palesata la necessità di utilizzare due differenti approcci nell'analisi statistica dei dati.

Nella prima fase di ricerca il metodo utilizzato è stato quello della deviazione standard (*DS* anche detta scarto quadratico metrico), per l'analisi dei dati a distribuzione normale allo scopo di rilevare la concentrazione intracellulare di magnesio negli otto soggetti presi in esame.

Questo metodo di analisi statistica viene utilizzato per determinare quanto e se un insieme di valori si discosta da quel valore che viene definito come *l'equilibrio*. Il risultato di questa analisi è un'indicazione quantitativa sulla “regolarità” della distribuzione di una serie di dati.

Qualora si proseguisse con la seconda fase della ricerca, si renderà necessario l'utilizzo dell'Analisi della Varianza (ANOVA) per le misure ripetute, tenendo però in considerazione anche eventuali variabili di confondimento (COVARIATE), che potranno venire prese in esame nella linea di intervento. Questo metodo si è necessario quando sorge la necessità di eseguire l'analisi dei dati a distribuzione variabile, per via della rilevazione della concentrazione di magnesio intracellulare nei diversi soggetti, rispetto ad una serie di variabili metaboliche nei soggetti stessi.

Il dato atteso da queste analisi è che le concentrazioni intracellulare e sierica di magnesio correlino significativamente in negativo coi valori secondari (parametri ematochimici ed antropometrici).

Il numero di pazienti necessario a rendere significativi i dati, utilizzando l'analisi ANOVA per misure ripetute, fissato il livello di errore family-wise a $\alpha=0,05$ e la potenza $(1-b)$ a 0,80, risulta essere di quattordici (14) soggetti.

5.2 Risultati ottenuti nella fase di ricerca

I campioni di esfoliato epiteliale e le analisi ematiche sono stati effettuati in tre date distinte ad intervalli di sessanta giorni gli uni dagli altri. Sugli iniziali otto soggetti arruolati nella prima fase di ricerca, solo sei hanno portato a termine le aspersioni quotidiane col magnesio spray.

Le osservazioni al microscopio ESEM sono state condotte in tre distinte giornate, ognuna temporalmente prossima al prelievo di cellule epiteliali.

La prima osservazione è da considerarsi poco significativa ai fini della ricerca del magnesio, visto che erano trascorsi troppi pochi giorni dalla prima assunzione di magnesio al prelievo di mucosa orale.

Come in precedenza accennato, i cheratinociti della mucosa orale hanno un turnover di circa 60 giorni, quindi solo gli strati più profondi dell'epitelio avrebbero potuto mostrare variazioni nell'incorporazione del magnesio somministrato sperimentalmente.

Di seguito vengono riportate diverse immagini ricavate con lo spettrometro EDAX, relative alla concentrazione di magnesio rilevate nei tre periodi di analisi svolti.

Le immagini sono ricavate attraverso l'EDS, lo spettrometro a dispersione di energia, strumento che permette un'analisi chimica elementare semiquantitativa dei campioni in esame.

Insieme alle immagini è significativo proporre al contempo un'analisi del campione, a cui è stato sottratto il "bianco", così da permettere una più accurata ricerca comparativa del magnesio e un suo eventuale aumento di concentrazione intracellulare.

Per "bianco" si intende un'analisi svolta su un campione di esfoliato al tempo 0, quindi precedentemente alla supplementazione col magnesio spray. Ciò si

è reso necessario, poiché i livelli di carbonio ed ossigeno all'interno di un campione biologico tendono a coprire tutti gli altri elementi data la loro preponderanza.

Essendo il magnesio presente in concentrazioni molto più basse rispetto a questi altri due elementi, anche variazioni minime sarebbero state di difficile lettura e quindi si è dovuti ricorrere a questo stratagemma per avere delle letture più chiare dello spettro EDAX.

5.2.1 Spettri relativi alla prima tornata di analisi

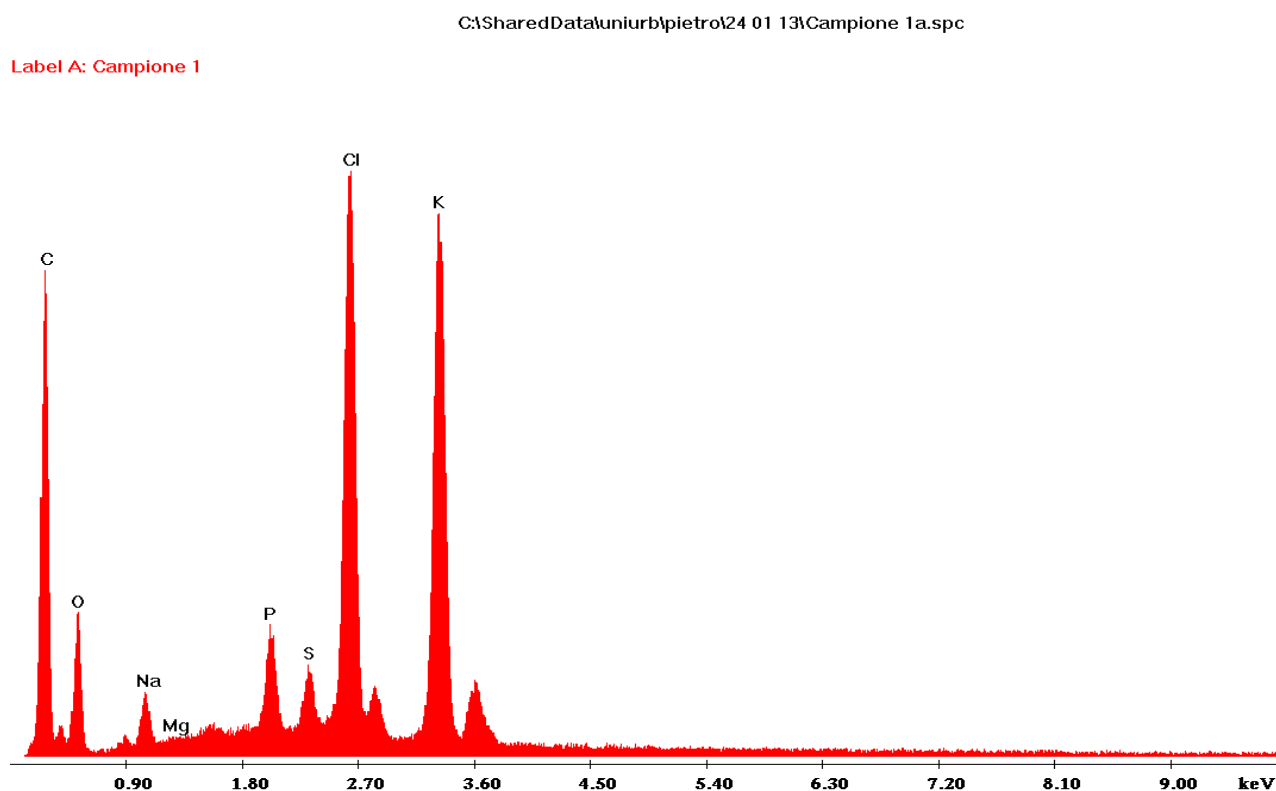


Figura 5: spettro 1/a.

Label A: Campione 1

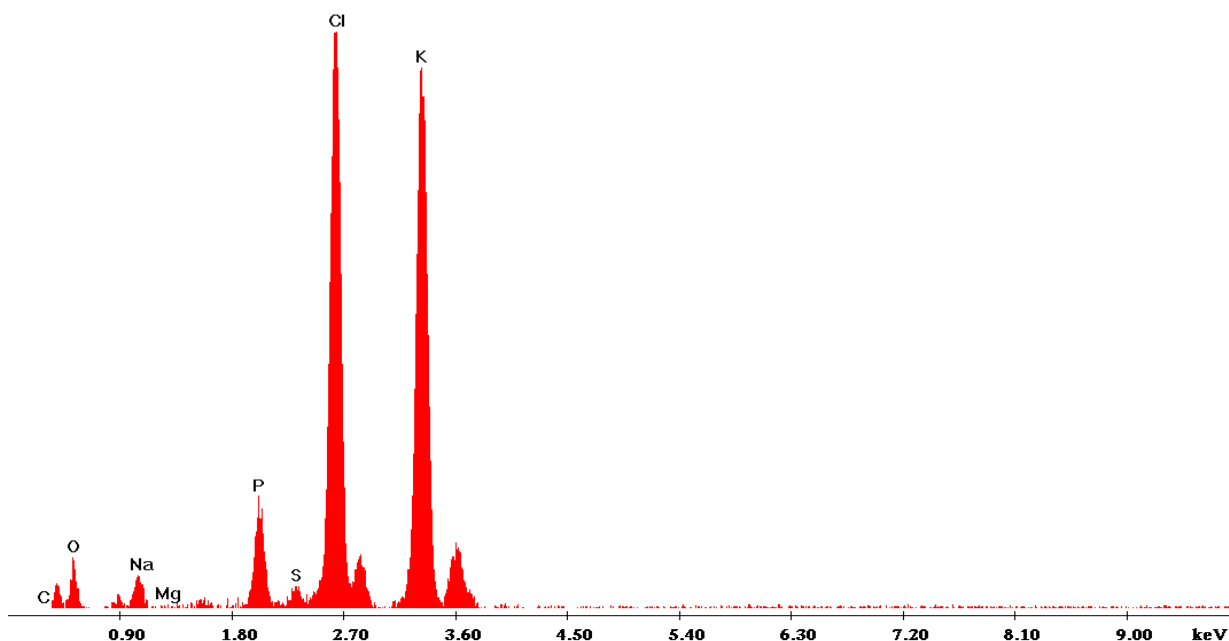


Figura 6: spettro 1/b.

Quelli riportati precedentemente, figura 5 e 6, sono due spettri appartenenti allo stesso soggetto ripresi col detector EDAX durante la prima osservazione. Notare come il magnesio sia in concentrazioni molto inferiori rispetto agli altri elementi rilevati.

Nello spettro 1/b, come precedentemente descritto, è stato sottratto lo standard, in maniera che l'ossigeno e il carbonio, elementi biologici costitutivi, non andassero a mascherare eccessivamente gli altri elementi presenti.

Il magnesio al tempo 0 rimane però quasi non osservabile anche con la sottrazione dello standard.

Label A: Campione 3

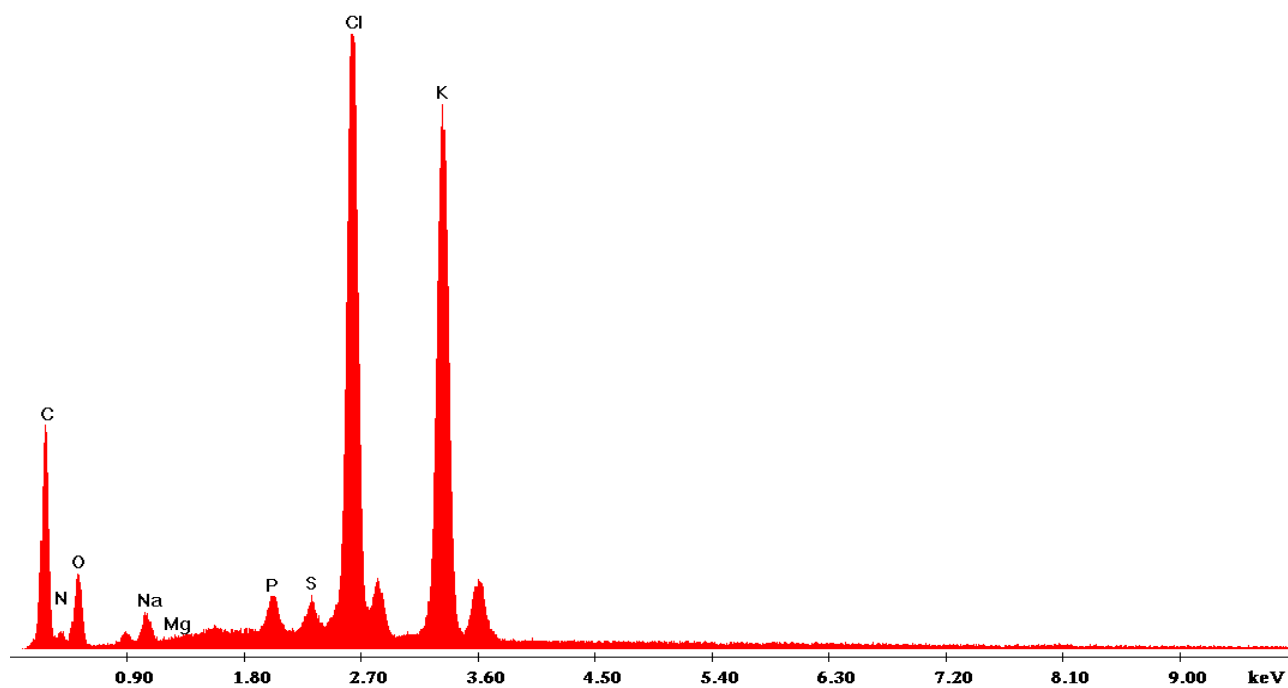


Figura 7: spettro 3/a.

Label A: Campione 3

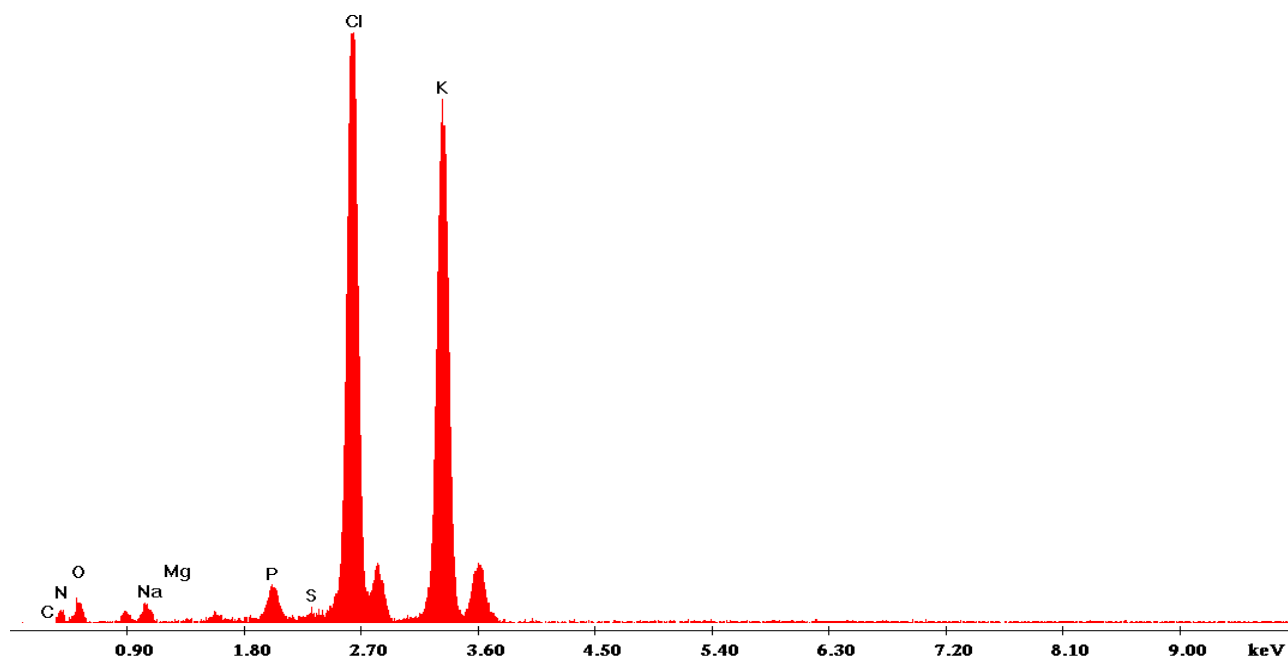


Figura 8: spettro 3/b.

Nelle figure 7 e 8 si possono notare altri due spettri relativi alla prima sessione di analisi. Nella figura 8, nonostante la sottrazione dello standard, il magnesio appare ancora di più di difficile individuazione rispetto allo spettro del soggetto numero 1.

5.2.2 Spettri relativi alla seconda tornata di analisi

Verranno ora presentati gli spettri relativi alla seconda tornata di analisi, effettuata due mesi esatti dopo la prima.

Dopo sessanta giorni di assunzione del magnesio spray si potrà notare anche dalla semplice analisi visiva degli spettri, come vi si la comparsa di un piccolo, ma significativo aumento della concentrazione intracellulare di magnesio negli stessi soggetti, che al tempo 0 mostravano una concentrazione di magnesio quasi non rilevabile dagli strumenti.

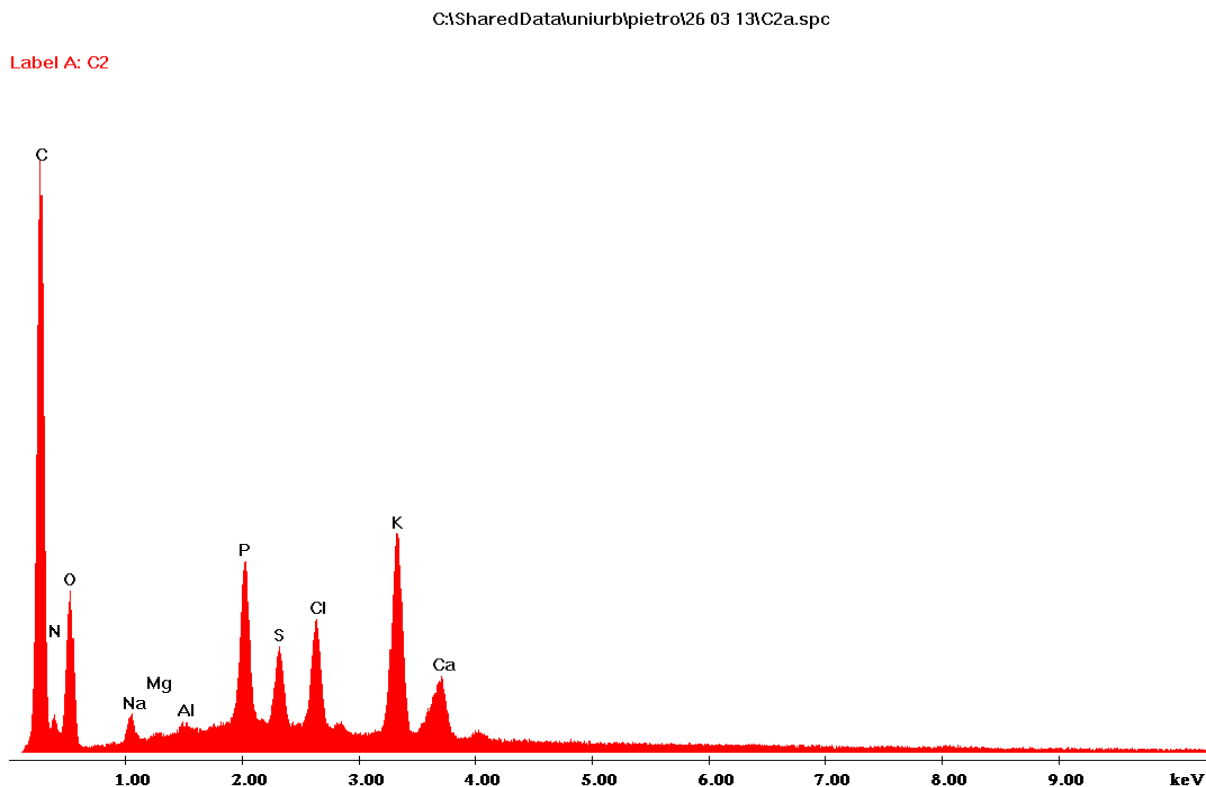


Figura 9: spettro 1/a/2.

Label A: C2

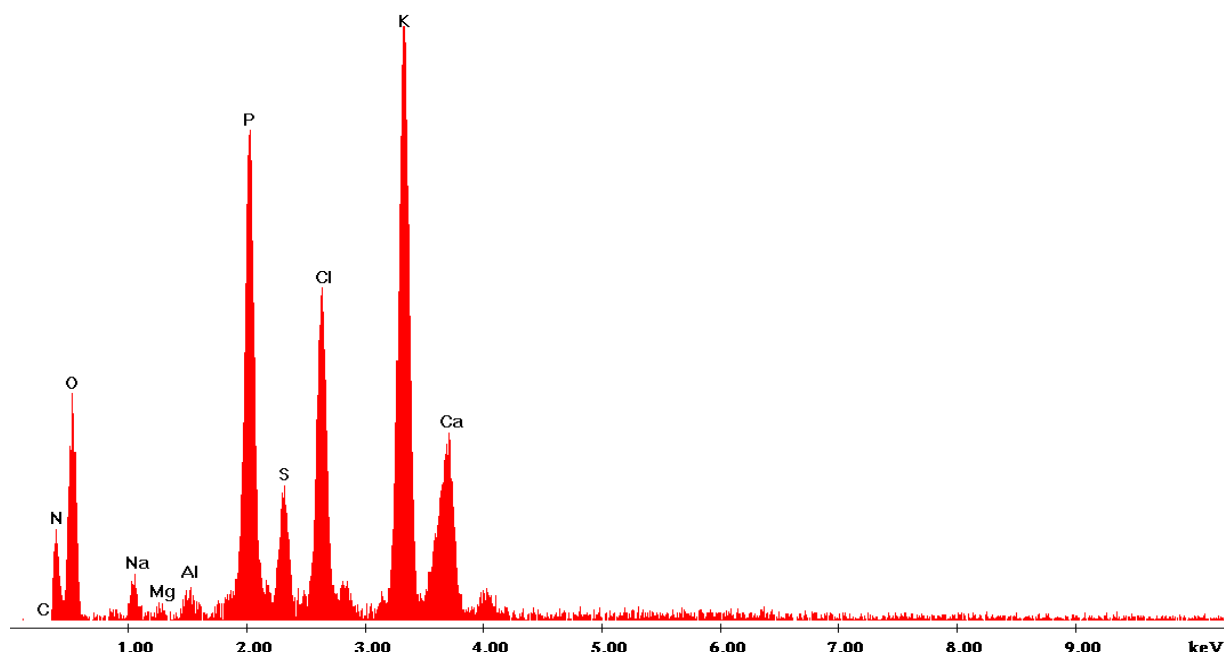


Figura 10: spettro 1/b/2.

Questi due spettri appartengono sempre al soggetto degli spettri 1/a e 1/b della prima sessione di analisi.

Lo spettro 1/b/2 è quello a cui è stato sottratto lo standard e che mostra quindi in maniera più accentuata l'aumento del picco di magnesio.

Di seguito vengono riportati gli spettri 3/a/2 e 3/b/2, che sono relativi allo stesso soggetto degli spettri 3/a e 3/b, ma effettuati nella seconda sessione di analisi. Anche in questi due spettri risulta evidente l'aumento del picco relativo alla concentrazione intracellulare di magnesio.

Il secondo spettro 3/b/2 è quello a cui è stato sottratto lo standard e che mostra ancora meglio rispetto al 3/a/2 un innalzamento del picco del magnesio.

Label A: C2

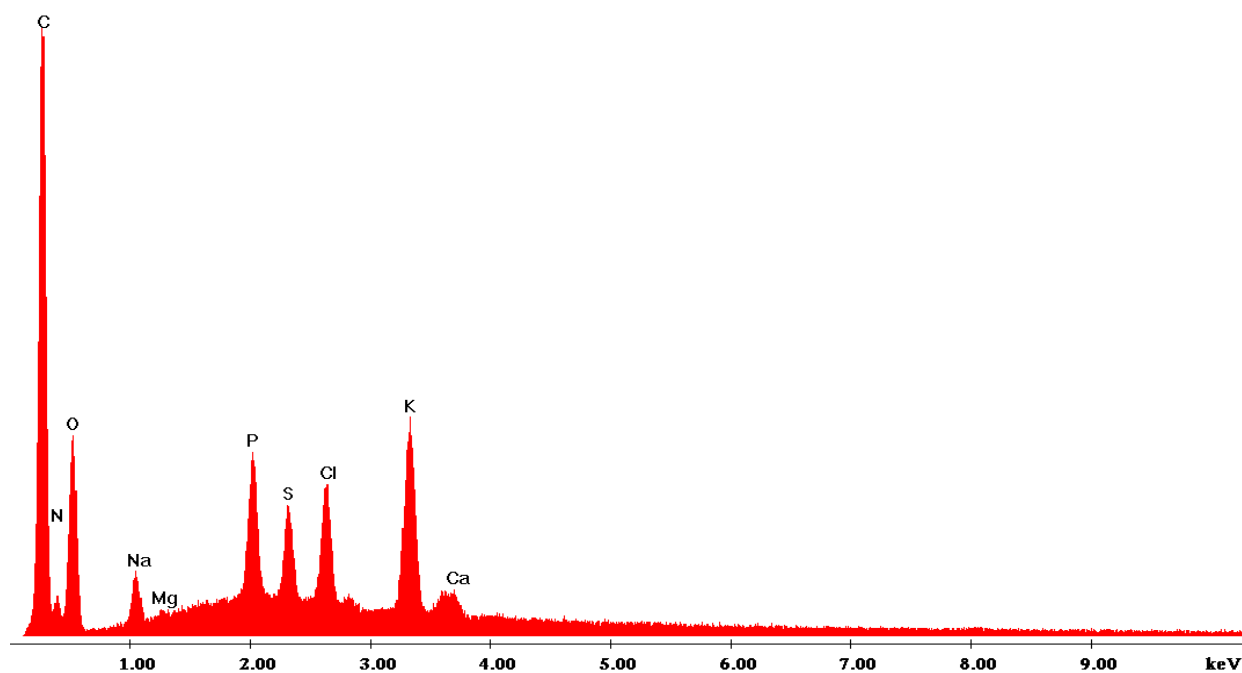


Figura 11: spettro 3/a/2.

Label A: C2

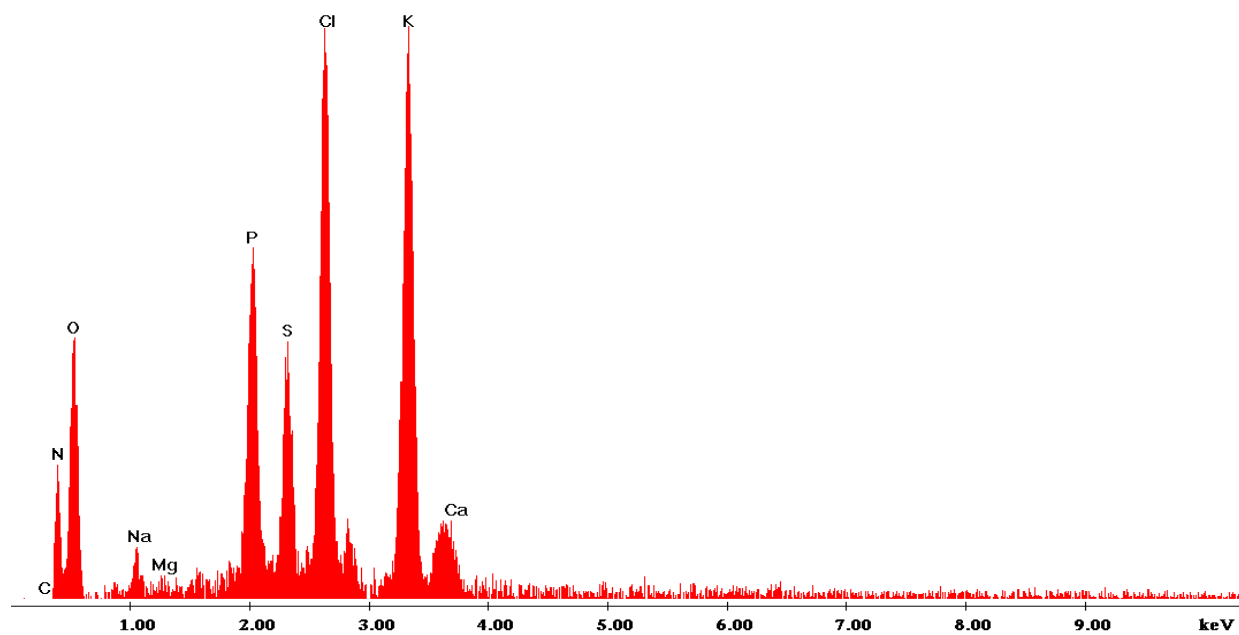


Figura 12: spettro 3/b/2.

5.2.3 Spettri relativi alla terza tornata di analisi

Questa serie di analisi si è svolta a centoventi giorni dall'inizio del trattamento con la soluzione sovrasatura di magnesio spray.

Come già visto nella tabella concernente la concentrazione ematica del magnesio, non si può apprezzare un aumento dei livelli di magnesio nel torrente ematico, che, anzi, in alcuni soggetti risulta addirittura inferiore rispetto al tempo 0.

Tutt'altro emerge dall'analisi dei grafici EDAX. Qui l'aumento delle concentrazioni intracellulari di magnesio è ben evidente in tutti i soggetti presi in esame, anche in quelli che al controllo precedente avevano mostrato picchi di magnesio quasi del tutto simili al controllo effettuato al tempo 0.

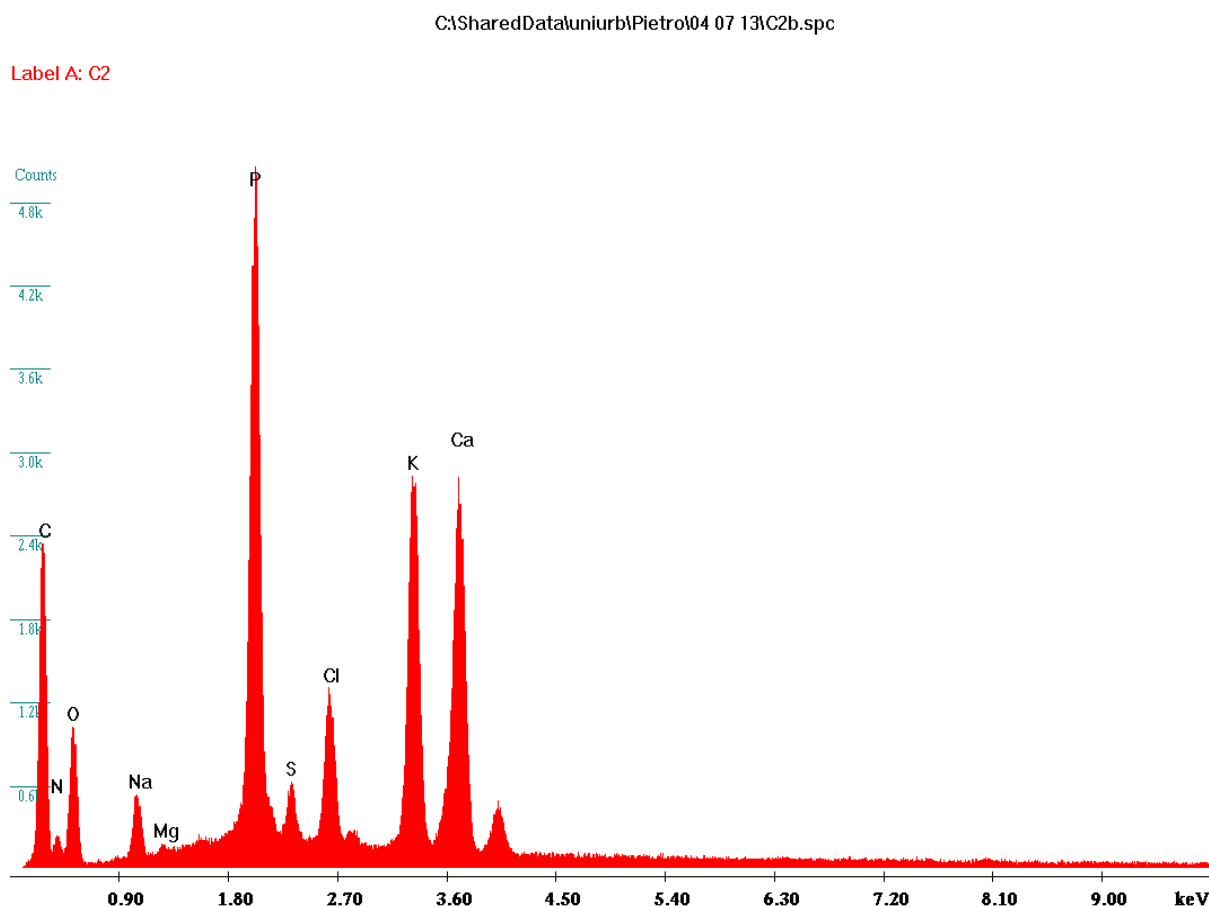


Figura 13: spettro 1/a/3.

Label A: C2

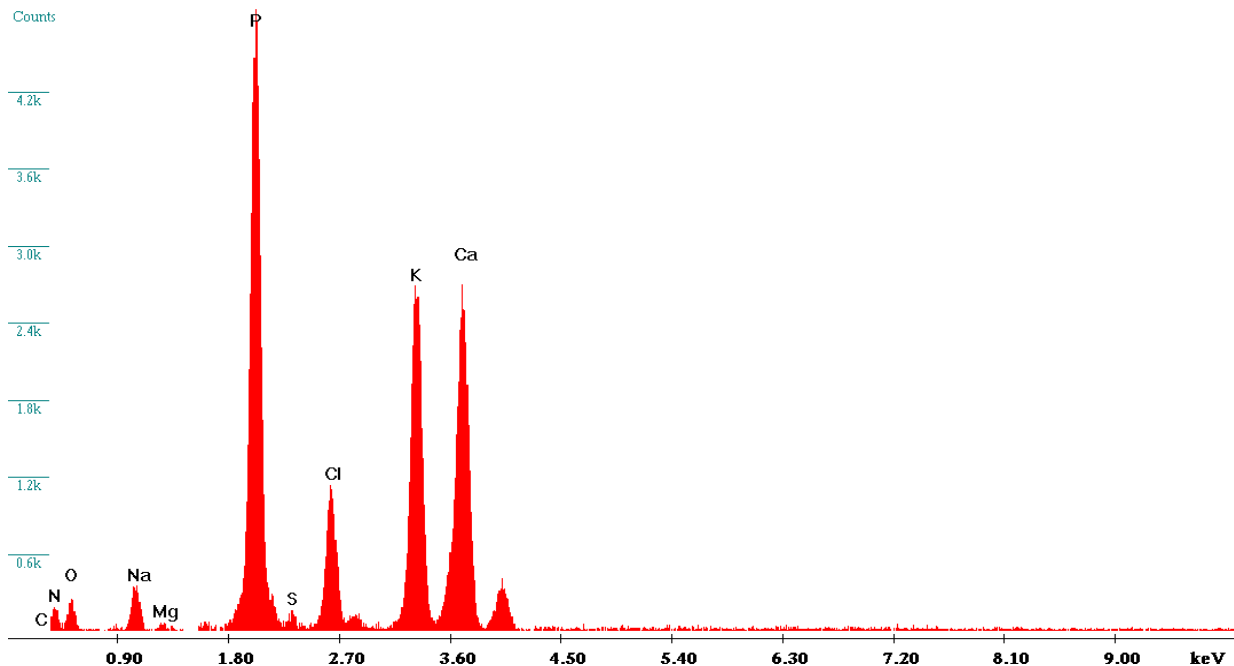


Figura 14: spettro 1/b/3.

Nell'immagine precedente viene presentato lo spettro con la sottrazione dello standard. Anche qui è evidente l'aumento dei livelli di magnesio.

Di seguito sono riportati gli spettri di un soggetto in precedenza non presentato. Qua gli aumenti di magnesio appaiono ad un primo rapido esame meno pronunciati rispetto agli altri spettri.

Il picco di magnesio permane molto basso nel primo spettro, ma è nel secondo spettro, quello a cui è stato sottratto lo standard, che appare del tutto evidente come i livelli di magnesio siano anche in questo soggetto aumentati rispetto alla media delle rilevazioni effettuate al tempo 0.

Label A: C3

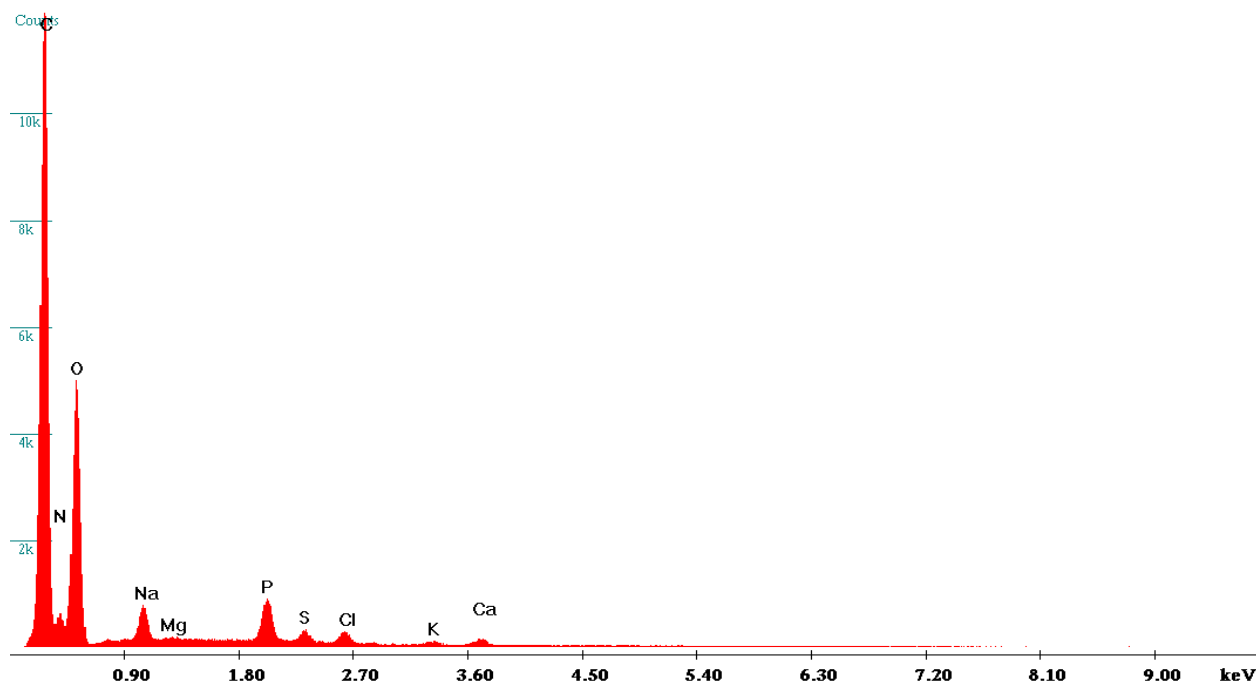


Figura 15: spettro 7/a/3.

Label A: C3

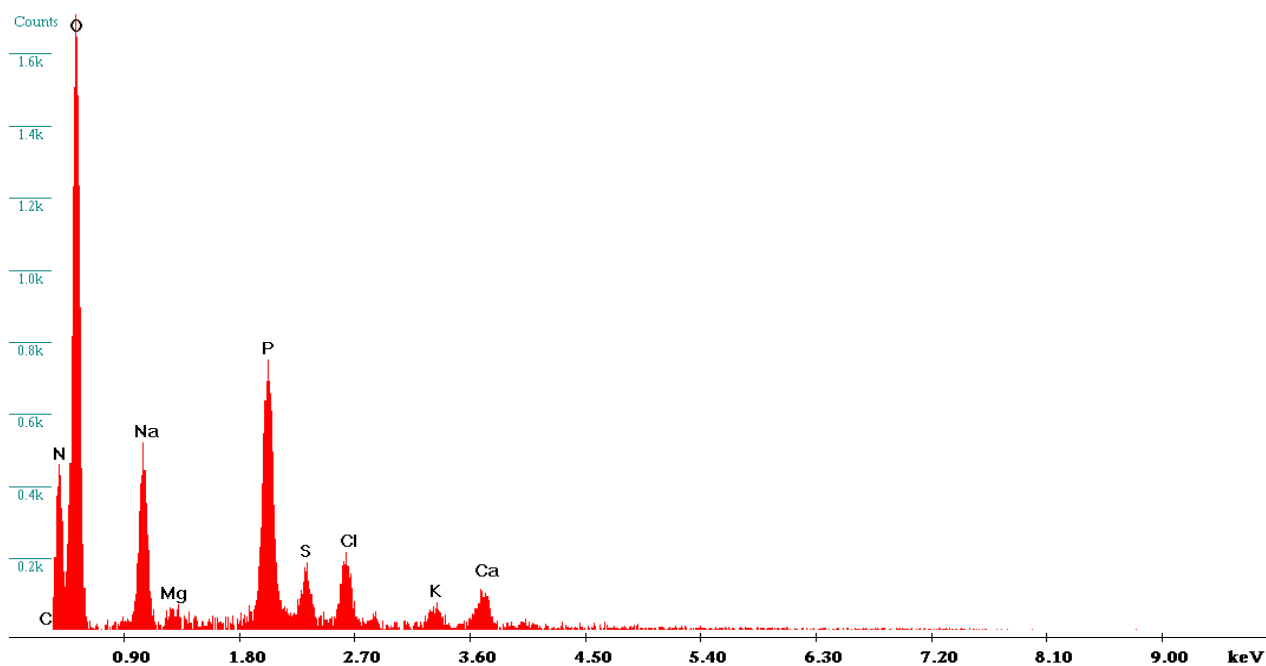


Figura 16: spettro 7/b/3.

Sono di seguito riportati gli spettri del soggetto numero 3, in modo da poter illustrare i cambiamenti dei livelli intracellulari di magnesio durante le tre sessioni di analisi svolte.

Anche in questi spettri gli aumenti dei picchi di magnesio sono particolarmente apprezzabili, soprattutto nella seconda immagine, nella quale vi è lo spettro con la sottrazione dello standard.

C:\SharedData\uniurb\Pietro\04 07 13\C6d7.spc

Label A: C6

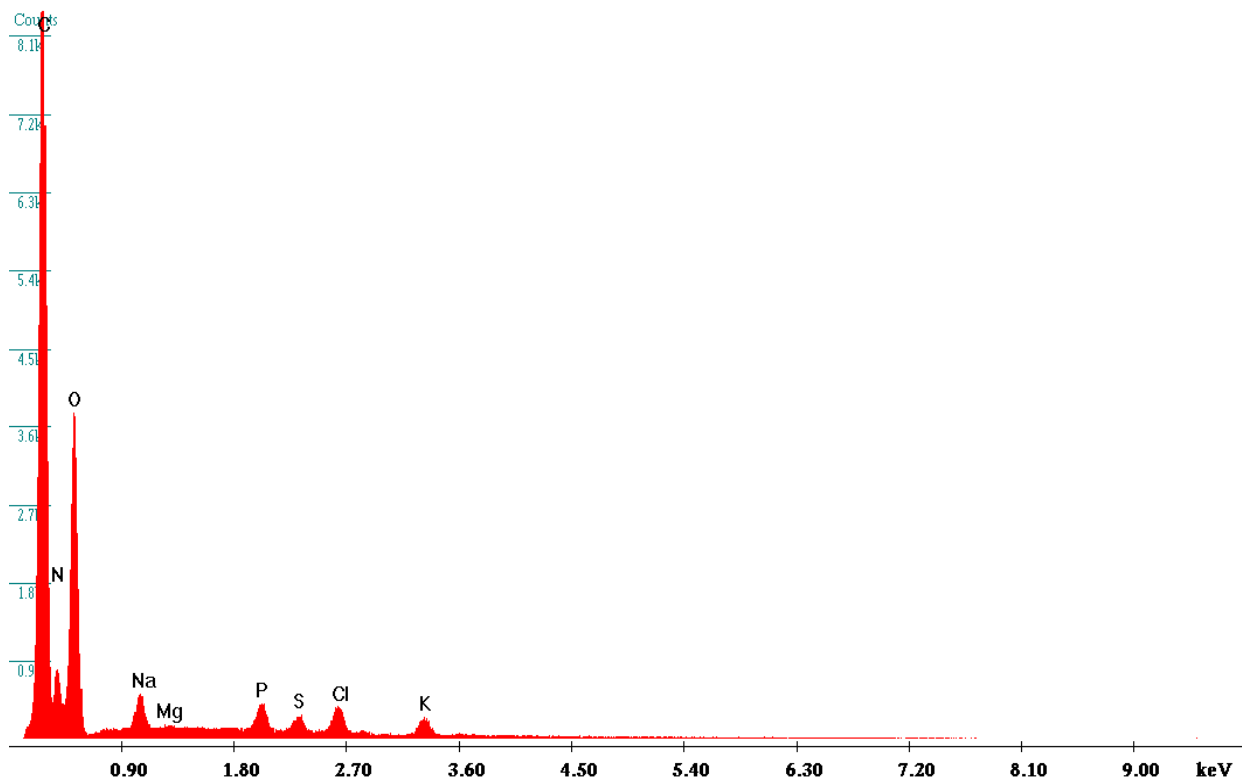


Figura 17: spettro 3/a/3.

Label A: C6

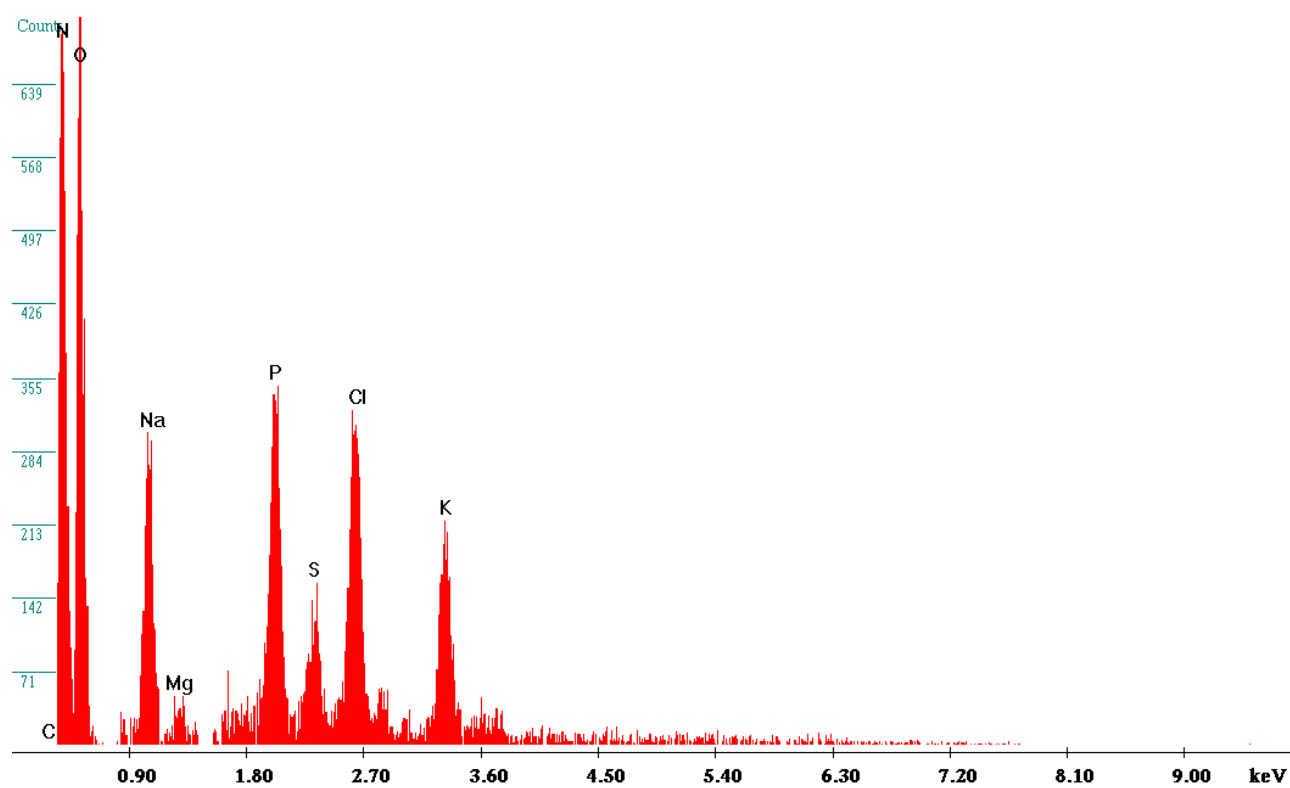


Figura 18: spettro 3/b/3.

6. Analisi e discussione dei risultati

Nella maggior parte dei soggetti reclutati, si può evidenziare un'effettiva incorporazione intracellulare del magnesio somministrato mediante spray nel corso del tempo.

L'assenza di effetti collaterali per questo tipo di supplementazione del magnesio e la sua efficacia possono essere presi in considerazione per un suo possibile uso in terapia coadiuvante nei pazienti affetti da sindrome metabolica.

Non sono poi da sottovalutare i bassi costi di questa terapia e la facilità di applicazione della stessa.

Il tema della riduzione dei costi nelle spese sostenute dal Sistema Sanitaria Nazionale si fa sempre più stringente in questi tempi, sia per l'aumentato costo delle terapie innovative introdotte, sia per la sempre più ampia incidenza della sindrome metabolica e dei suoi negativi sviluppi, diabete di tipo II ed ipertensione in primis, nella popolazione.

Se si ipotizza, che una normale terapia endovenosa con magnesio solfato in fiale con concentrazione 1g/10ml e dal costo medio di 0,68€⁵¹ l'una, ha dei lunghi cicli di durata, la dose varia tra 1 e 3 grammi al giorno, ai quali si devono aggiungere i costi della soluzione da 500ml di sodio cloruro al 0,9% nella quale disperdere la fiala di magnesio, costo medio di 1,80€, e i costi degli aghi e delle cannule, si può desumere, che i costi della soluzione di magnesio spray, nell'ordine dei 5€ circa a confezione, risultino molti inferiori sia se fossero a carico del Servizio Sanitario Nazionale, che del paziente stesso.

A questo mero calcolo economico, non si può evitare di aggiungere la totale controindicazione delle soluzioni endovenose di magnesio nei pazienti affetti da miocardiopatie e gravi insufficienze renali, nei pazienti che assumono farmaci depressori del sistema nervoso centrale, è risaputo che il magnesio amplifica l'effetto dei barbiturici, degli ipnotici e degli anestetici locali, nei

pazienti che assumono calcio-antagonisti, in quanto la concomitante assunzione di magnesio e calcio causa una severa ipotensione e, infine, nei pazienti che hanno delle pregresse patologie gastrointestinali o soffrono di disturbi del metabolismo e della digestione.

Per quanto riguarda la farmacocinetica e la farmacodinamica del magnesio somministrato per via transepiteliale non ci sono ancora dati disponibili, né questa ricerca ha inteso investigare se il magnesio si trovasse in forma libera nelle cellule o se fosse accumulato in qualche vescicola o organulo.

Tuttora mancano opportune tecniche analitiche sensibili per distinguere il magnesio intracellulare tra la sua forma libera e quella Mg^{2+} complessata. Mancano quindi gli studi dettagliati pure sulla distribuzione intracellulare del magnesio e una meta-analisi di quelli presenti ha portato a risultati spesso contraddittori⁴⁴.

Alcuni studi condotti per determinare i livelli di magnesio totale e libero/ionizzato con tecniche di electron probe X-ray microanalysis (EPXMA)⁴⁵, P-NMR (risonanza magnetica nucleare del fosforo), elettrodi selettivi per il Mg^{2+} o indicatori fluorescenti, hanno fatto emergere, che la concentrazione totale di Mg nelle cellule di tessuto muscolare cardiaco e in fibre muscolari scheletriche, tra i pochi tessuti di sono noti i valori esatti, è dell'ordine millimolare, con valori che variano tra 14 e 20 mM nella maggior parte dei tessuti considerati⁴⁶.

Una causa della difficile determinazione del magnesio risiede nella mancanza di sonde specifiche per la ricerca del magnesio, si ricordi la definizione "*ione dimenticato*"^{40,41}, poiché la maggioranza delle sonde normalmente utilizzate deriva frequentemente da un adattamento di quelle utilizzate per la ricerca del calcio intracellulare.

Il magnesio presenta alcune caratteristiche chimiche, che lo rendono capace di legare fosfolipidi, proteine, acidi nucleici, cromatina e nucleotidi e ne spiegherebbero la scarsa differenza di concentrazione (15-18 mM) tra mitocondri, nucleo e reticolo endoplasmatico.

Solo una frazione di questo elemento, circa il 15-20% si troverebbe in forma libera ionizzata nel lumen degli organelli cellulari, come suggerito da studi effettuati su mitocondri isolati da cellule di fegato e cuore di topo.^{47 48}

Da questi dati presenti in letteratura, si può quindi desumere, che il magnesio individuato grazie al detector EDAX sia soprattutto di natura citoplasmatica, che rappresenta la frazione più grande e rilevabile di questo catione.

Il magnesio citoplasmatico è quasi completamente legato all'ATP, con la quale forma solidi complessi, con fosfometaboliti e nucleotidi fosfati in generale.

A causa di questi ligandi, la concentrazione citosolica libera di magnesio rimane molto bassa e rappresenta solo il 5% dei livelli di magnesio totali⁴⁹.

Il microscopio ESEM si è però rivelato fondamentale, grazie al detector EDAX, per le analisi semiquantitative, che hanno portato ad individuare il magnesio all'interno delle cellule osservate, mentre le analisi ematochimiche, sono e saranno da ritenersi non fondamentali per proseguire questo tipo di ricerche, poiché l'aumento dei livelli di magnesio non avviene a livello del torrente ematico, ma solo a livello intracellulare, luogo in cui è conservato il 99% delle scorte totali.

Come precedentemente discusso, nei pazienti con una efficiente funzione renale, il magnesio presente nel torrente ematico viene quasi tutto espulso con le urine e una piccola frazione viene persa pure con la sudorazione, azione di dispersione che aumenta notevolmente durante i periodi estivi.

Un altro elemento da prendere in considerazione successivo a questo lavoro di ricerca, potrebbe essere andare ad investigare il ruolo competitivo dello ione calcio Ca^{2+} , come antagonista nell'assorbimento del magnesio.

Alcuni studi mostrano come una ipercalcemia porti ad una considerevole riduzione dell'assorbimento di magnesio, che è nell'ordine del 24-85% a livello cellulare⁵⁰.

Dall'analisi degli spettri EDAX non si riesce a notare questo effetto antagonistico del calcio nei confronti di magnesio, anche in quei soggetti nei

quali il picco del calcio risulta molto più accentuato. Probabilmente riuscendo a seguire meglio i soggetti anche con un'analisi dettagliata della dieta si potrebbero immaginare diverse relazioni tra questi due cationi, ma dati più interessanti andrebbero ricavati dai pazienti sofferenti di sindrome metabolica, nei quali anche questo antagonismo del calcio potrebbe giocare un ruolo, da tenere in considerazione, ma non di primissimo piano, per capire le cause dei bassi livelli di magnesio intracellulari.

Bisogna aggiungere, che questa competizione calcio-magnesio è stata riscontrata attraverso l'assunzione orale ed endovenosa di questi minerali.

Nel modello spray l'assunzione di magnesio diverge notevolmente, poiché l'assorbimento non inizia a livello gastro-intestinale per poi passare nel torrente ematico e, quindi, non si devono attivare tutti quei trasportatori che verrebbero spiazzati dallo ione Ca^{2+} impedendo così l'assorbimento di magnesio, che, rimanendo nel torrente ematico, finirebbe escreto con l'urina.

Una fase successiva e di sicuro interesse di questa ricerca, potrebbe essere l'analisi delle concentrazioni di magnesio intracellulare nei pazienti affetti da sindrome metabolica che si atterranno alla terapia con la soluzione spray sovrasatura di magnesio. Essendoci delle evidenze, come già ampiamente descritto, della carenza di questo minerale nei soggetti affetti da sindrome metabolica, sarebbe opportuno verificare i miglioramenti che potrebbe arrecare la terapia a base di magnesio spray associata alle altre cure.

Se si dovesse notare un aumento delle concentrazioni di magnesio intracellulare, a due e a quattro mesi dall'inizio della terapia, come condotto nella parte iniziale di questo studio nei soggetti sani, si potrebbero sicuramente aprire nuove strade per la cura della sindrome metabolica e l'alleviamento dei suoi effetti, che sono sempre più dannosi nelle popolazioni dei paesi industrializzati, ma che iniziano ad affacciarsi con prepotenza anche tra le popolazioni dei paesi in via di sviluppo.

Ecco infine i dati sui costi per i farmaci espressi in milioni di dollari, elaborati dal Centro di Ricerche sull'Assistenza Sanitaria e Sociale dell'Università

Bocconi⁵², ricavati dai dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sulla spesa farmaceutica a livello mondiale.

La spesa per i farmaci ipoglicemizzanti, assunti quotidianamente dai malati di diabete di tipo 2, uno degli esiti più comuni della sindrome metabolica, nel periodo 2011-2013 è aumentata di ben il 103% in termini di spesa, passando da 499,4 a 1063,7 milioni di dollari. Un balzo sicuramente enorme, che indica chiaramente una diffusione sempre meno controllata delle malattie connesse agli stati iperglicemici.

Un altro dato, che aiuta a capire la diffusione di questa categoria di farmaci anche nei cosiddetti paesi in via di sviluppo è la modesta crescita nel biennio 2011-13 in Italia, periodo nel quale l'aumento registrato è stato nell'ordine dell'8,3%.

La recente introduzione delle nuove insuline esclude nella maggior parte dei casi la possibilità di avere sul mercato, in tempi brevi, farmaci biosimilari e il costo per paziente a carico del Servizio Sanitario Nazionale rimane molto elevato.

Il proseguimento dello studio sui vari benefici della composizione spray del magnesio sui pazienti sofferenti di sindrome metabolica, la facilità di utilizzo della soluzione, è da rimarcare come la fedeltà alle terapie a lungo termine dei pazienti sia in molti casi di difficile ottenimento, unita alla quasi totale assenza di effetti collaterali, i bassi costi d'impiego e il drammatico aumento a livello mondiale delle patologie iperglicemizzanti non possono non indurre una approfondita riflessione sulla nuova forma d'impiego del magnesio proposta con questo studio e aprire così nuove prospettive per la cura della sindrome metabolica.

7. Note bibliografiche

- 1 Lusk, J.E.; Williams, R.J.P.; Kennedy, E.P. (1968). "Magnesium and the growth of *Escherichia coli*". *Journal of Biological Chemistry* 243 (10): 2618–2624.
- 2 Leroy, J. (1926). "Necessite du magnesium pour la croissance de la souris". *Comptes Rendus de Seances de la Societe de Biologie* 94: 431–433.
- 3 A. L. Hodgkin e A. F. Huxley, Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre, in *Nature*, vol.144, n°3651, 1939, p.710,
- 4 Slutsky, I.; Abumaria, N.; Wu, L. J.; Huang, C.; Zhang, L.; Li, B.; Zhao, X.; Govindarajan, A.; Zhao, M. G.; Zhuo, M.; Tonegawa, S.; Liu, G. (2010). "Enhancement of Learning and Memory by Elevating Brain Magnesium". *Neuron* **65** (2): 165–77.
- 5 Champagne CM. Magnesium in hypertension, cardiovascular diseases, metabolic syndrome and other conditions, a review. *Nutr Clin Pract* 2008; 23(2): 142-51.
- 6 Rosanoff A, Seelig MS. Comparison of mechanism and functional effects of magnesium and statin pharmaceuticals. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(5): 501s-5s.
- 7 Chacko SA, Song Y et al. Relations of dietary magnesium intake to biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in an ethnically diverse cohort of postmenopausal women. *Diabetes Care* 2010; 33(2): 304-10
- 8 Villegas R, Gao YT et al. Dietary calcium and magnesium intakes and the risk of type 2 diabetes: the Shangay Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(4): 1059-67.
- 9 He K, Liu K, Daviglus ML et al. Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome in young adults. *Circulation* 2006; 113: 1675-82.
- 10 Rosanoff A, Weaver CM, Rude RK. Suboptimal magnesium status in the United States: are health consequences underestimated? *Nutr Reviews* 2012; 70(3): 153-64.
- 11 Beydoun MY, Gary TL et al. Ethnic differences in dairy and related nutrient consumption among US adults and their association with obesity, central obesity and metabolic syndrome. *Am J of Clin Nutr* 2008; 87: 1914-25.
- 12 Lima de Souza e Silva ML, Cruz T et al. Magnesium replacement doesn't improve insulin resistance in patients with metabolic syndrome: a 12 week randomized double blind study. *J Clin Med Res* 2014; 6(6): 456-62.
- 13 Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Bioph* 2007; 458(1): 90-102.
- 14 Arnaud MJ. Update on the assessment of magnesium status. *Br J Nutr* 2008; 99(S3): 24-36.
- 15 Resnick ML, Gupta RK et al. Hypertension and peripheral insulin resistance: possible mediating role of intracellular free magnesium. *Am J Hypertension* 1990; 3(5): 373-79.
- 16 Silver BB. Development of cellular magnesium nano-analysis in treatment of clinical magnesium deficiency. *J A Coll Nutr* 2004; 23(6): 732-37.
- 17 De Lourdes Lima M, Cruz T, et al. Serum and intracellular magnesium deficiency in patients with metabolic syndrome – evidences for its relation to metabolic syndrome. *Diab Res Clin Prac* 2008; 83(2): 257-62.
- 18 Grundy SM, Brewer B et al. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute / American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-38.

- 19 Isomaa B, Almgren P et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 14(4): 683-89.
- 20 H.M. Lakka, The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men, in *JAMA*, vol.288, 2002, p.2709
- 21 A. I. Adler, I. M. Stratton, H. A. Neil; et al, Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study, in *BMJ*, vol. 321, 2000, pp. 412-419.
- 22 Grundy SM. Metabolic syndrome scientific statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2005; 25: 2243-44.
- 23 Isomaa B, Almgren P et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 14(4): 683-89.
- 24 Y. Harano, M. Suzuki, Y. Koyama, et al, Multifactorial insulinresistance and clinical impact in hypertension and cardiovascular diseases, in *J Diabetes Complications*, vol.16, 2002, pp.19-23.
- 25 Bonora R, Kiechl S, et al: Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Brunick Study. *Diabetes* 47, 1643-9, 1998.
- 26 Lostroh AJ, Krahl ME. Magnesium, a second messenger for insulin: ion transport activity. *Adv Enzyme Regul*1974; 12: 73-81.
- 27 Takaya J, Higashino H et al. Effects of insulin and insulin-like growth factor IGF-1 on intracellular magnesium of platelets. *Exp Mol Pathol* 1998; 65: 104-09.
- 28 Resnick ML, Gupta RK it al. Hypertension and peripheral insulin resistance: possible mediating role of intracellular free magnesium. *Am J Hypertension*1990; 3(5): 373-79.

- 29 G. Paolisso, A. Scheen, F. D'Onofrio, P. Lefèbvre (1990), 'Magnesium and glucose homeostasis', in *Diabetologia*, 33: 511-514
- 30 Takaya J, Higashino H, Yohnusuke K. Intracellular magnesium and insulin resistance. *Magnesium Res* 2004; 17 (2): 126-36.
- 31 Huerta MG, Roemmich JN et al. Magnesium deficiency is associated with insulin resistance in obese children. *Diabetes Care*2005; 28: 1175-82.
- 32 Mooren FC, Kruger K et al.Oral magnesium supplementation reduces insulin resistance in non-diabetic subjects; a double blind –placebo controlled randomized trial. *Diab Obes Metab*2011; 13(3): 281-84.
- 33 Volpe SL. Magnesium, the metabolic syndrome, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Crit Rev Food Sc Nutr* 2008; 48(3): 293-300.
- 34 Ardenne M und Beischer D (1940). "Untersuchung von Metalloxyd-rauchen mit dem Universal-Elektronenmikroskop".*Zeits. F. Elektrochem.***46**: 270–277.
- 35 Lane, W.C. (1970). "The environmental control stage". *Scanning Electron Microscopy*. pp. 43–48.
- 36 Danilatos, G.D., and Robinson, V.N.E. (1979). "Principles of scanning electron microscopy at high specimen pressures". *Scanning* **2**: 72–82.
- 37 Mancuso, J.F.; Maxwell, W.B.; Danilatos, G.D. U.S. Patent 4,785,182 filed May 21, 1987. "Secondary electron detector for use in a gaseous atmosphere"
- 38 Rosanoff A, Weaver CM, Rude RK. Suboptimal magnesium status in the United States: are health consequences underestimated? *Nutr Reviews* 2012; 70(3): 153-64.
- 39 Silver BB. Development of cellular magnesium nano-analysis in treatment of clinical magnesium deficiency. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(6): 732-37.
- 40 Gonzalez W, Altieri PI, Alvarado S, Banchs HL, Escobales N, Crespo M, Borges W. Magnesium: the forgotten electrolyte. *Bol Asoc Med P R.* 2013;105(3):17–20.
- 41 Elin RJ. Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *Am J Clin Pathol.* 1994;102(5):616–622.
- 42 Hashizume N, Mori M. An analysis of hypermagnesemia and hypomagnesemia. *Jpn J Med.*

1990;29:368–372.

43 Wong ET, Rude RK, Singer FR, Shaw ST. A high prevalence of hypomagnesemia and hypermagnesemia in hospitalized patients. *Am J Clin Pathol.* 1983;79:348–352.

⁴⁴ F. I. Wolf, A. Cittadini. *Mol. Asp. Med.*, 2003, 24:11-26

⁴⁵ T. Gunther. *Magnes. Bull.*, 1996, 18:2-6.

⁴⁶ A. Romani, A. Scarpa. Regulation of Cell MAgnesium. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 298(1):1-12.

⁴⁷ D. W. Jung, L. Apel, G. P. Brierley. *Biochemistry*, 1990, 29:4121-4128.

⁴⁸ G. A. Rutter, N. J. Osbaldeston, J. G. McCormack, R. M. Denton. *Biochem. J.*, 1990, 271:627-634.

⁴⁹ Romani, A. Scarpa. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 298:1-12.

⁵⁰ M. Schweigel, H. Martens. *Front. Biosci.*, 2000, 5:D666-D677.

⁵¹ I costi sono calcolati sulla media dei costi dei prodotti equivalenti presenti in commercio nella banca dati Unifarm.

⁵² AA.VV. “La diffusione dei farmaci biotecnologici, la loro costo-efficacia e i trend legati all'associazione farmaco-test per biomarker”. Centro Studi e Ricerche sulle Biotecnologie Sanitarie e Settore Biotech (CeSBIO).